

신장 피질 기저막 소포에서 p-Aminohippurate 이동의 특성에 대한 연구*

—음이온의 효과—

부산대학교 의과대학 생리학교실

이 상 호 · 정 진 섭 · 김 용 근

= Abstract =

Characteristics of p-Aminohippurate (PAH) Transport in Basolateral Membrane Vesicles of Rabbit Kidney Cortex —Effect of Anion—

Sang Ho Lee, Jin Sup Chung and Yong Keun Kim

Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University

Effects of anions on p-Aminohippurate (PAH) transport across the basolateral membrane (BLM) were studied. Basolateral membrane vesicles were isolated from rabbit renal cortex by using a self-orienting Percoll-gradient centrifugation and Mg^{2+} -precipitation. The characteristics of the membrane vesicles was examined by marker enzyme activity, membrane orientation and transport studies. The Na-K-ATPase activity in the fraction containing BLM vesicles was enriched 9-fold, and the alkaline phosphatase activity in the fraction containing BBM vesicles was increased 9-fold, compared with those of the homogenate. The transport properties of the two membrane preparations were studied by a rapid filtration technique. The uptake of PAH by BLM was sensitive to changes in medium osmolarity and inhibited by probenecid.

When the uptake of $50\mu M$ PAH in voltage-clamped BLM vesicles was determined in the presence of various anions in the incubation medium, cis inhibitions by SO_4 and SSO_3 were observed in the presence of sodium gradient (out > in). Sodium-dependent PAH uptake was inhibited competitively by external SO_4 . PAH uptake in BLM vesicles loaded with 20 mM acetate and SO_4 or 200 μM PAH was significantly stimulated as compared with unloaded vesicles. The extent of trans-stimulation of PAH uptake by SO_4 was increased with the inside concentration of SO_4 . This trans-stimulatory effect by SO_4 was observed to be additive in the presence of Na gradient and completely inhibited by 2 mM probenecid and 1 mM SITS.

These results demonstrate that PAH/anion exchange is present in BLM of renal cortex and in this exchange mechanism inorganic as well as organic anions are involved as substrates.

서 론

P-Aminohippurate (PAH)를 포함한 많은 유기산이

*본 연구는 1985년도 한국과학재단 연구비로써 이루어진 것임

신장 근위세뇨관에서 능동적으로 분비되는 것으로 알려져 있다(Cross and Taggart, 1950). 유기산이 이 분비계를 통해 분비될 때 근위세뇨관 세포의 기저막(basolateral membrane, BLM)과 세뇨관강막(brush-border membrane BBM)의 두개의 막을 통과하는데 이때 적어도 포유류 신장에서는 두 막중 기저막을 통한 이

등이 운반체를 통한 능동적 과정임이 밝혀져 있다(Tune et al., 1969). 그러나 운반체의 성상이나 이동의 energetics에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다.

PAH 이동에 대한 여러 양이온의 효과는 많이 연구되었으나(Chung et al., 1970; Podevin et al., 1978; Sheikh and Møller, 1982) 음이온이 PAH 이동에 영향을 미칠 수 있는 지에 대해서는 자세히 연구된 바가 없다. 신피질 절편을 이용한 실험에서 대사물질의 일종인 acetate, pyruvate, lactate등이 Na⁺ 이동에 유의한 변화없이 PAH 이동을 증가시키며(Møller and Sheikh, 1983), 적혈구에 존재하는 Cl/HCO₃ 교환계의 강력한 억제 물질인 Stilbene 유도체인 DIDS, SITS 등이 PAH 이동을 강력히 억제시키고(Hong et al., 1978; Koschier et al., 1980), Cl를 SCN이나 NO₃로 대체시 PAH 이동이 경쟁적으로 억제되는 것이 보고되어(Goldinger et al., 1980) PAH 이동계에 여러가지 음이온이 영향을 미칠 수 있을 것으로 시사되어 왔다. 그뒤 신장 기저막 소포를 이용한 실험에서 Berne와 Kinne(1976)가 BLM을 통한 유기산의 이동이 세포대사에 의해 생성된 음이온과의 교환에 의해 일어날 수 있을 것을 시사하였고 Sheikh와 Møller(1983)는 Na 농도 경사가 없는 신피질 절편에서 세포내의 fumarate가 PAH 이동을 증가시키는 것을 관찰하여 PAH 이동이 세포내부의 유기 음이온과의 교환기전에 의해 일어날 수 있음을 보였다.

최근 Löw등(1984)은 쥐의 신장 기저막 소포에서 PAH 농도 경사가 무기 음이온인 Sulfate의 이동을 증가시키는 것을 관찰하여 신장 기저막에 유기 음이온 뿐아니라 무기 음이온의 이동도 가능한 음이온 공동 교환계가 존재함을 시사하였다. 그러나 세뇨관강막 소포에서 PAH 이동이 다른 음이온과의 교환에 의해 일어날 수 있다는 보고는 있으나(Bolmstedt and Aronson, 1980; Kahn et al., 1983) 기저막 소포에서 PAH 이동에 대한 음이온 특히 무기 음이온 자체의 효과에 대해서는 자세히 연구된 바가 없으며, PAH 이동에 미치는 음이온의 직접적인 영향에 대해서는 BLM 소포를 이용한 실험에서 보고된 바가 적다.

따라서 저자들은 가토 신장 피질에서 기저막 소포를 분리하고 이 막소포를 통한 PAH 이동에 음이온이 어떤 영향을 미치는지 관찰하여 PAH가 신장 기저막에서 음이온과의 교환기전에 의해 이동될 수 있는 지를 보다 확실히 밝히고자 본 실험을 시행하였다.

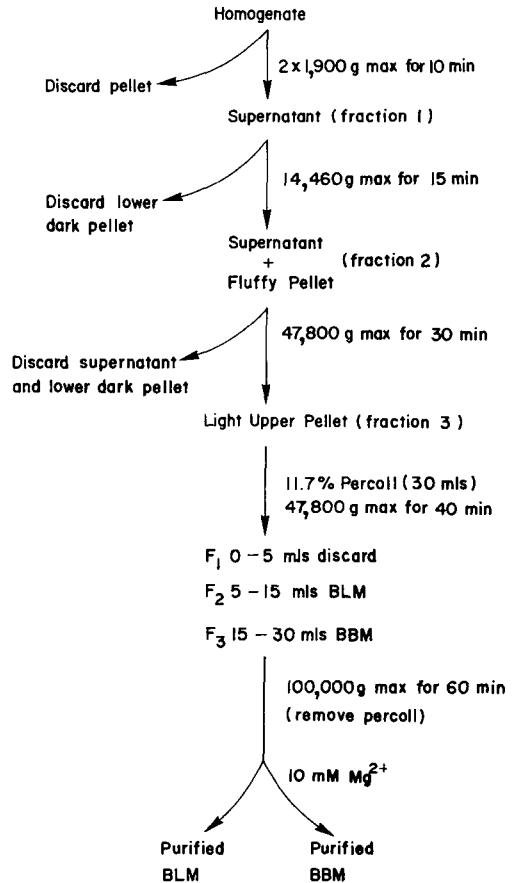


Fig. 1. Vesicle isolation scheme. BLM, Basolateral membrane; BBM, Brush Border membrane. See text for detailed description.

실험 방법

1. 막소포의 분리

체중 1.5~2 kg의 가토를 경부 탈골시켜 희생시킨 후 신장을 적출하고 혈액을 제거한 후 피막을 벗기고 신피질부분만 분리하였다. 분리한 신피질을 250 mM sucrose와 10 mM triethanolamine으로 된 sucrose 완충용액(pH 7.6 at 4°C)에 10배(W/V)로 희석한 후 Potter-Elvehjem 조직파쇄기(20 strokes, 1,800 rpm)로 homogenate를 만들었다. 막소포는 Kinsella등(1979)과 Scalera등(1980)의 방법을 약간 변형시켜 Sorvall RC-5B centrifuge(SS-34 Rotor)를 이용하여 분리하

였고(그림 1) 모든 조작은 4°C에서 행하였다. 그 분리 방법은 간단히 설명하면 다음과 같다. Homogenate를 10분동안 1,900 gmax에서 원심분리 후 상층액을 모으고 pellet는 다시 원래 부피의 1/2되게 희석하여 다시 1,900 gmax에서 10분간 원심분리한 후 pellet는 버리고 상층액을 합쳐서 14,460 gmax에서 15분간 원심분리하였다. 상층액과 pellet의 연합 상층 부분을 모아 47,800 gmax에서 30분간 원심분리하고 상층액과 하부 검은 pellet는 버리고 fluffy layer만 모아서 26.5 ml의 sucrose 완충용액에 희석시켰다. 여기에 3.5 ml의 Percoll을 가한 후 47,800 gmax에서 40분간 원심분리한 후 상층으로부터 처음 5 ml는 버리고 다음 5~13 ml는 기저막으로 모으고 다음 14~30 ml까지를 세뇨관강막으로 모았다. 세뇨관강막은 Mg²⁺ precipitation에 의해 더욱 순수 분리하였다. 이와같이 얻어진 분획에 같은 부피의 sucrose완충액을 가한 후 Sorvall OTD-75B 초원심분리기에서 100,000 gmax로 1시간 동안 원심분리하여 percoll을 제거하였고 각 막소포는 25 gauge 주사침에 여러번 통과시켜 적절한 완충액에 단백질 농도가 8~10 mg/ml되게 희석하였다. 막소포는 37°C에서 30분간 preincubation한 후 사용시까지 4°C에서 보관하였고 분리한 후 2일내 사용하였다.

2. Marker enzyme 측정

Na-K-ATPase 활성도(E.C.3.6.1.3)는 Jørgensen과 Skou의 방법(1971)으로 측정하였다. 0.25 mg의 효소단백질을 0.6 mg/ml deoxycholate(DOC) 포함하거나 포함하지 않는 2 mM EDTA와 25 mM Immidazole(pH 7.0)로 된 용액내에서 25°C에서 preincubation하였다. 30분 뒤 100 μl를 취하여 130 mM NaCl, 20 mM KCl 그리고 30 mM histidine(pH 7.5)을 포함한 용액으로 옮겨 37°C에서 10분간 다시 preincubation하고 최종 농도를 3 mM되게 ATP와 MgCl₂를 가하여 반응을 시작하였다. 10분 뒤 6% perchloric acid 200 μl를 가하여 반응을 중지시킨 후 유리된 무기인산의 양은 Fiske와 SubbaRow의 방법(1925)으로 측정하였다. Alkaline phosphatase 활성은 Linhardt와 Walter의 방법(1963)으로 하였다. 막소포를 7.6 mM p-nitrophenol phosphate와 100 mM glycine(pH 10.5)를 포함한 용액에서 37°C로 15분간 incubation한 후 0.02 M NaOH 5 ml를 가하여 반응을 중지시키고 410 nm에서 흡광도를 측정하

였다. 단백질 농도는 gamma globulin을 표준 시약으로 하여 Bradford의 방법(1976)으로 측정하였다.

3. 막소포에서 PAH 이동의 측정

막소포를 통한 PAH 이동은 ³H-PAH를 이용하여 급속여과법(Berner and Kinne, 1976)으로 측정하였다. Incubation 용액의 자세한 조성은 각 그림의 설명에서 표시하였다. 음이온의 효과를 보는 실험에서는 막소포내외에 100 mM K 존재하에 2 μM valinomycin으로 처리하여 막전압의 변화를 방지하였다. 실험은 25°C로 유지한 incubation 용액에 부피의 12.5%에 해당하는 양의 막소포(8~10 mg/ml)를 가하여 시작하였고 일정시간 후 100 μl를 취하여 filter를 통해 급속히 여과시켰다. Filter를 5 ml의 냉한 100 mM mannitol, 100 mM NaCl, 20 mM Hepes-Tris(pH 7.5) 용액으로 세척한 후 1 ml 2-methoxyethanol에서 녹였으며 여기에 10 ml의 scintillation cocktail을 가하여 Liquid scintillation counter(Packard Tricarb 300 C)로 측정하였다. Filter는 Millipore HAWP(pore size 0.45 μm)를 사용하였고 100 mM NaCl, 1 mM PAH, 1 mM Tris-Hepes(pH 7.4)에 실험 하루 전 담구어 두었다가 사용하였다. 비특이적으로 filter에 결합된 PAH양은 막소포없이 동량의 incubation용액을 filter를 통해 여과시켜 측정하였으며 PAH의 이동량은 비특이적으로 filter에 결합된 PAH양을 교정한 후 pmole/mg proten으로 나타내었다. 실험결과는 mean±SEM으로 나타내었고 유의성은 p value가 0.05이하인 것을 유의한 것으로 하여 Student's t-test로 검정하였다.

4. 사용시약

PAH, Probenecid, HEPES, Tris, Ouabain, ATP, Triethanolamine HCl, K gluconate 은 Sigma회사로부터, Percoll은 Pharmacia Fine Chemicals로부터, Protein 측정시약은 Biorad Laboratories에서 그리고 ³H-glucose 및 ³H-PAH는 Amersham으로부터 구입하였다.

실험 결과

1. 막소포의 특성

기저막과 세뇨관강막의 각 marker enzyme인 Na-

Table 1. Marker Enzymes Activities in Each Fraction

	Na-K-ATPase activity (μ mole Pi/mg protein/hr)	Alkaline phosphatase (μ mole p-nitrophenol/mg protein/hr)
Homogenate	13.93 \pm 2.24	0.84 \pm 0.06
BBM	15.80 \pm 0.70	7.76 \pm 0.12
BLM	116.43 \pm 9.32	1.16 \pm 0.35

BBM, brush-border membrane; BLM, basolateral membrane.

Each value represents the mean \pm SEM of 6 experiments.

K-ATPase 및 alkaline phosphatase 활성을 homogenate, 기저막 및 세뇨관강막 소포에서 각각 측정하였다(표 1). Na-K-ATPase 활성은 homogenate에서 13.9 μ mole Pi/mg protein/hr 인데 비해 기저막소포에서 116.4 μ mole Pi/mg protein/hr이었다. 이 값은 다른 저자들에 의해 보고된 값과 유사하였다(Kinsella et al., 1979; Scalera et al., 1981). 기저막소포에서의 alkaline phosphatase 활성은 1.16 μ mole p-nitrophenol/mg protein/hr으로 homogenate의 1.5배이었으나 순수분리한 세뇨관강막의 활성도에 비해 6배 정도 낮았다. 주로 right-side out orientation을 가지는 세뇨관강막 소포에 비해 기저막 소포의 orientation은 저자들에 따라 일정치 못하다. 기저막 소포의 sidedness는 ATP 가수분해가 막의 안쪽에서 일어나고 ouabain은 막 외부에 결합한다는 사실을 이용하여 Na-K-ATPase 활성의 detergent에 의한 증가 정도에 의해 계산이 가능하다. 표 2는 본 실험에서 얻어진 기저막 소포의 orientation을 계산하여 나타낸 것이다. Detergent인 deoxycholic acid (DOC)가 없을 때 나타나는 Na-K-ATPase 활성은 open vesicle에 의해 기인된 것이다. 따라서 open vesicle의 비는 DOC없을 때와 DOC 존재시의 Na-K-ATPase의 비, 즉 B/D 0.78였으며 DOC 없을 때 나타나는 총 ATPase 활성은 open vesicle과 inside-out vesicle (IOV)에 의해 나타나는 것이다. 총 ATPase 활성에 대한 open vesicle이 차지하는 비는 BC/D가 되며 IOV에 의한 총 ATPase 활성은 A·(BC/D)가 될 것이다. 따라서 총 ATPase 활성에 대한 비는 [A·(BC/D)]/C 즉 0.06이다. 따라서 right side out (ROV)의 비는 그 차인 0.232이다. 따라서 소포의 23.2%는 right-side out이고 6.0%는 inside out이며 나머지 70.8%가 open or leaky vesicle이다.

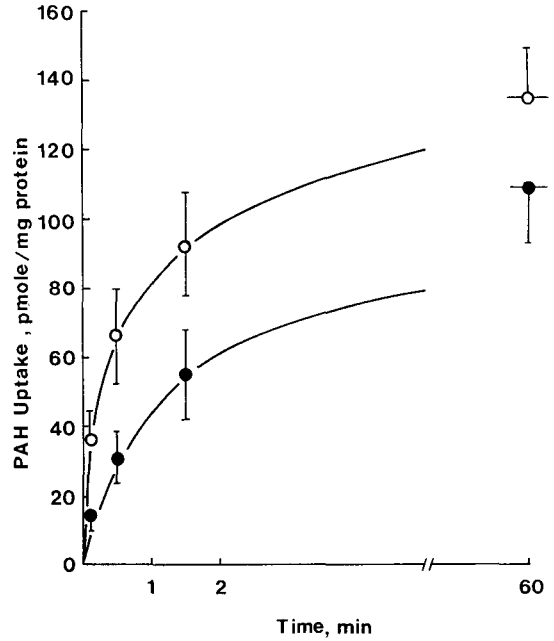


Fig. 2. Dependence of the PAH uptake into basolateral membrane vesicles on the osmolarity of the incubation medium after 1 hr of incubation. The membranes were prepared in 100 mM mannitol and 20 mM HEPES-Tris (pH 7.4). The PAH uptake was determined at 25°C in a medium containing 50 μ M 3 H-PAH, 100 mM mannitol, 100 mM NaCl, 20 mM HEPES-Tris (pH 7.4) and various concentration of sucrose. The osmolarity, given in reciprocal value, was increased by addition of sucrose. Each value represents the mean \pm SEM of 3 duplicate experiments.

위 방법으로 분리한 막소포가 물질이동 특성을 유지하고 있는지를 알아보기 위하여 PAH의 이동을 측정하였다. 그림 2는 기저막 소포에서 60분동안 PAH의 이동량에 대한 용액의 osmolarity의 효과를 나타낸 것으로 용액내 osmolarity가 증가함에 따라 PAH 이동량은 감소하여 PAH 이동과 osmolarity의 역수사이에 직선적인 상관관계가 있었다. 이 그림에서 직선이 Y축과 교차하는 값은 PAH의 막소포에 대한 결합을 나타내는 것으로 총 측정량의 약 7.5%에 해당하는 값으로 Berner와 Kinne(1976)의 결과와 유사하였다. 그림 3은 기저막 소포에서 PAH 이동을 Na 농도 경사 존재하에서 incubation 시간에 따라 측정된 것이다. PAH 이동은 2

Table 2. Determination of Vesicle Orientation

ATPase	Total	Na-K
Control (-DOC)	120.97±4.31(A)	82.43±8.04(B)
+DOC	157.93±10.94(C)	116.43±9.32(D)
ROV	23.2%	1.00- (open+IOV)
IOV	6.0%	[A-(BC/D)]/C
Open	70.8%	B/D

DOC, deoxycholic acid; ROV, right-side-out; IOV, inside-out
Each value represents the mean±SEM of 6 experiments.

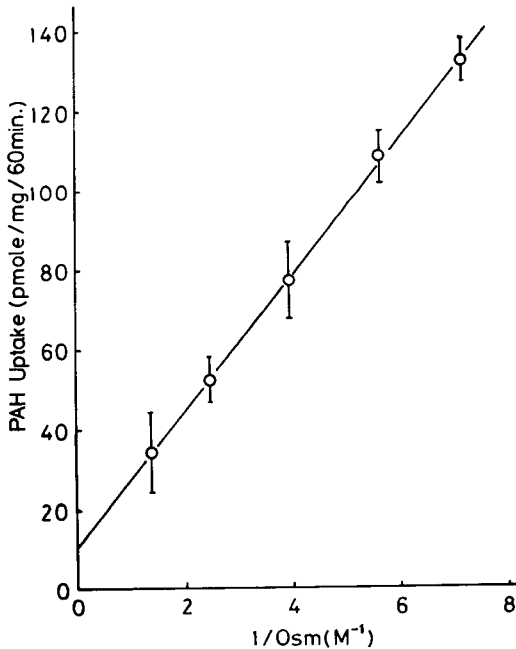


Fig. 3. Time course of PAH uptake. The experimental conditions were the same as on Fig. 2 except for the absence of sucrose. The uptake of PAH by basolateral membrane vesicles at various times of incubation is shown in the absence (○) and in the presence (●) of 2 mM probenecid. Each value represents the mean±SEM of 4 duplicate experiments.

mM probenecid에 의해 억제되었고 60분 후에 측정된 평균값은 135 pmole PAH/mg protein/hr로 Kinsella등 (1979) 및 Goldinger등(1984)의 결과와 유사하였다.

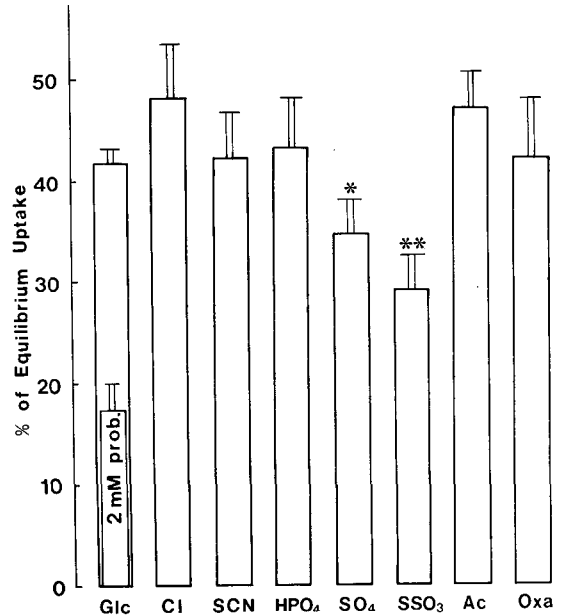


Fig. 4. Cis-inhibition of PAH uptake by anions in the presence of inwardly gradient of Na. Basolateral membrane vesicles were preloaded with 100 mM mannitol, 100 mM K, 100 mM gluconate, and 20 mM HEPES-Tris (pH 7.4). The 20-sec PAH uptake was determined in 100 mM Na, 100 mM K, 180 mM gluconate, 50 μM ³H-PAH, 2 μM valinomycin and 20 mM indicated anions. The data were expressed as a percentage of equilibrium uptake. Each value represents the mean±SEM of 5 duplicate experiments. Glc, gluconate, Ac, Acetate; Oxa, oxalate.
*, p<0.05 **, p<0.01

이상의 결과는 본 실험에서 분리한 기저막 소포에 근위세뇨관 세포의 물질 이동 능력이 유지되고 있음을 의미한다.

2. 외부 음이온의 억제효과

그림 4는 PAH 이동에 미치는 20 mM의 여러가지 음이온의 효과를 관찰한 것으로 incubation은 20초간 행하였고 결과는 PAH 이동의 평형값의 %로 나타내었다. 음이온 대체에 의해 나타나는 막전위의 변화에 의한 효과를 없애기 위하여 기저막 소포내외에 100 mM K를 가지고 2 μM valinomycin 존재하에서 막전위 고정을 시킨 상태에서 실험을 행하였다. Gluconate 존재시 측정값을 기준으로 했을 때 Cl, SCN, HPO₄, acetate 및 oxalate는 Na 존재하에서 PAH 이동에 영향을 미치지

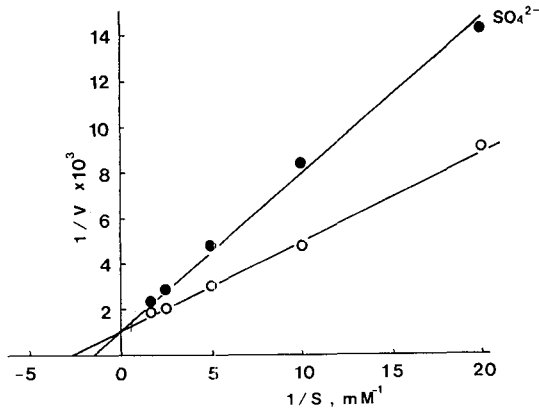


Fig. 5. Lineweaver-Burk plots of probenecid-sensitive PAH transport (20 sec) into basolateral membrane vesicles in the absence (○) and presence (●) of 50 mM SO₄. Each value represents the mean of 3 duplicate experiments. The experimental conditions were the same as in Fig. 4 except for the concentrations of PAH.

못하였으나 SO₄ 및 SSO₃는 각각 30%와 50%씩 probenecid에 민감한 PAH 이동을 억제하였다. 결과는 나타내지 않았으나 Na 농도 경사가 없을 때는 음이온들이 PAH 이동에 영향을 미치지 못하였다. 그림 5는 SO₄의 효과가 PAH 운반체에 대한 직접 작용에 의해 나타나는 것인지를 알기 위하여 동력학적 분석을 시행한 것이다. Na 존재하에서 각 PAH 농도에서 2mM probenecid 존재시와 없을 때의 20초간 이동값을 구하였고 probenecid에 억제되는 값을 취하여 Lineweaver-Burk plot 한 것이다. 대조군에서 Km 값을 370 μM, Vmax 값은 952.38 pmole/mg protein/20 sec로 Berner와 Kinne(1976) 및 Kinsella등(1979)의 결과와 유사한 값이었고 Km 값은 신피질 절편에서 Ecker와 Hooke(1974) 및 Park등(1971)이 관찰한 값과 유사하였다. 50 mM SO₄ 존재시 Km 값이 670 μM로 증가하고 Vmax 값은 일정하여 전형적인 상경적 억제 양상을 나타내었다.

3. 내부 음이온의 자극 효과

그림 6은 기저막 소포에서 PAH 이동이 음이온과의 교환기전에 의해 일어날 수 있는지를 관찰하기 위하여 행

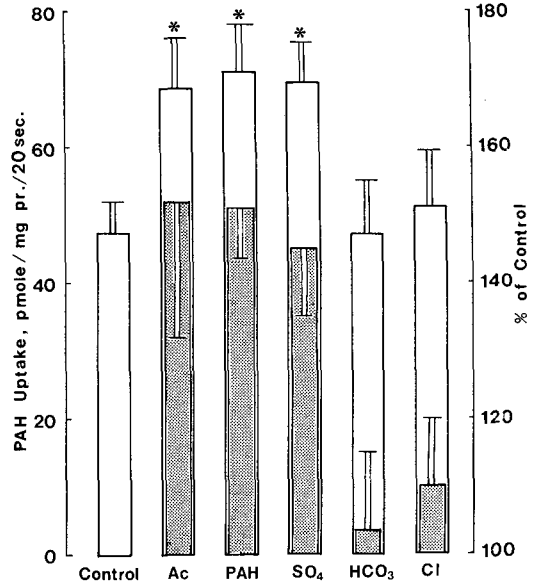


Fig. 6. Trans-stimulation of Na-independent PAH uptake by various anions. Basolateral membrane vesicles were preloaded with 100 mM mannitol, 100 mM K, 20 mM HEPES-Tris (pH 7.4) and 100 mM gluconate (control) or 80 mM gluconate plus 20 mM of the indicated anions. PAH uptake was determined in a buffer containing 100 mM mannitol, 100 mM K, 100 mM gluconate, 2 μM valinomycin, 20 mM HEPES-Tris (pH 7.4) and 50 μM ³H-PAH. All experiments were performed in the presence of valinomycin. Each value represents the mean ± SEM of 7 duplicate experiments and the dotted bar represents percentage of control. *, p < 0.05

한 실험결과이다. Na 농도 경사 없는 상태에서 여러가지 음이온을 소포에 부하(preloading) 시킨 후 20초 동안 incubation 한 후에 ³H-PAH 이동 값을 나타낸 것이다. 실험에 사용된 여러 음이온 중 20 mM acetate, 25 mM SO₄ 및 200 μM PAH는 PAH 이동을 음이온이 부하되지 않는 대조군에 비해 현저히 증가시켰으며 HCO₃와 Cl는 영향을 미치지 못하였다. 그림 7은 소포내 SO₄²⁻ 농도를 증가시키면서 PAH의 이동에 대한 trans-stimulation의 효과를 관찰한 것이다. 소포내 SO₄ 농도가 10 mM부터 50 mM까지 증가함에 따라 PAH 이동은 비례하여 증가하였다. 그림 8은 SO₄를 소포내 부하시킨 후 나타나는 PAH의 이동 증가가 Na 농도 경사에 의해

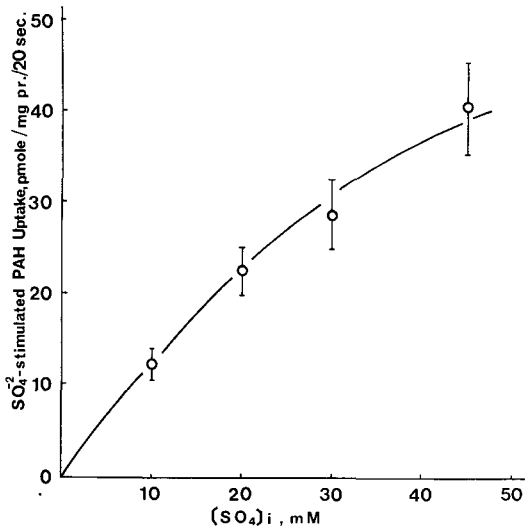


Fig. 7. Trans-stimulation of PAH uptake by various concentrations of SO₄. SO₄ concentration was varied from 10 to 50 mM in the preloading media with a corresponding decrease in gluconate to keep ionic strength constant. The experimental conditions were the same as in Fig. 6 except for various concentrations of SO₄ in the preloading media. Each value represents the mean ± SEM of 4 duplicate experiments.

어떤 영향을 받은 지를 관찰한 결과이다. 20 mM SO₄ 만 소포내 부하되었을 때 나타난 PAH 이동량에 비해 외부에서 내부로 100 mM Na 농도 경사가 존재할 시 PAH 이동이 더욱 증가되었으며, SO₄ 부하와 Na 농도 경사가 동시에 가해졌을 때 PAH 이동량은 부가적으로 증가되는 결과를 보였다. 그림 9는 소포 내부에 SO₄의 부하에 의해 증가된 PAH 이동에 probenecid와 음이온 교환기전의 억제 물질인 SITS가 어떤 효과를 나타내는 지를 나타낸 것이다. 그림에서 나타낸 것처럼 내부 SO₄나 외부 Na 농도 경사에 의해 증가된 PAH의 이동은 2 mM probenecid와 1 mM SITS에 의해 완전히 억제되었다. 이러한 결과는 PAH/SO₄ 교환기전이 운반체에 의해 매개되는 이동과정임을 가르키고 있다.

고 찰

본 연구에서는 Percoll gradient를 이용하여 세뇨관강

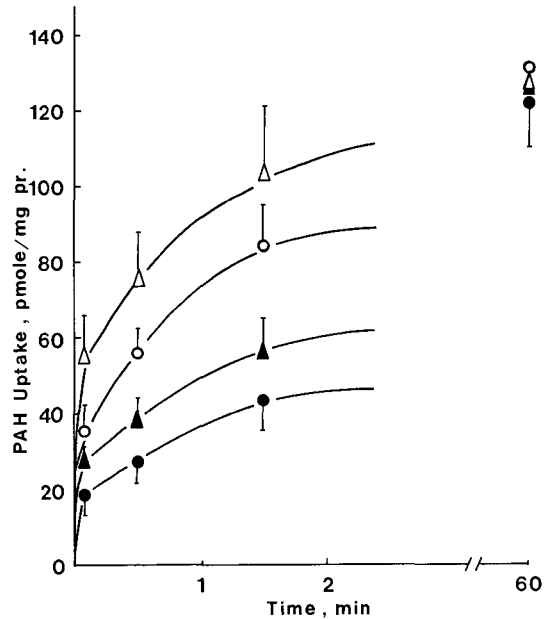


Fig. 8. Effects of Na gradient (out > in) and SO₄ preloading on PAH uptake. Membranes were preloaded with 100 mM mannitol, 100 mM HEPES-Tris (pH 7.4) and 100 mM gluconate (○, ●) or 80 mM gluconate plus 20 mM SO₄ (△, ▲). PAH uptake was performed in a buffer containing 100 mM K, 100 mM gluconate, 20 mM HEPES-Tris (pH 7.5), 2 μM valinomycin, 50 μM ³H-PAH and 100 mM Na gluconate (△, ○) or 200 mM mannitol (▲, ●). Each value represents the mean ± SEM of 3 duplicate experiments.

막과 기저막 소포를 분리하였다. 막소포를 이용한 물질 이동의 연구에서는 막의 적절한 분리가 이루어졌는 지를 확인하는 것이 중요하다. 막소포가 순수하게 분리되는 지를 확인하는데 marker enzyme를 자주 이용하는데 신장에서는 Na-K-ATPase와 alkaline phosphatase가 각각 기저막과 세뇨관강막의 marker로서 많이 이용되고 있다.

본 연구에서 기저막의 Na-K-ATPase 활성은 homogenate의 활성의 9배인 116 μmole Pi/mg protein/hr로 Kinsella등(1979)과 Scalera등(1981)의 결과와 유사하였고 Inui등(1981)의 결과보다는 높았다. 기저막 분획의 alkaline phosphatase 활성이 homogenate에 비해 1.5배 정도 높아 세뇨관강막이 일부 혼합되어 있는

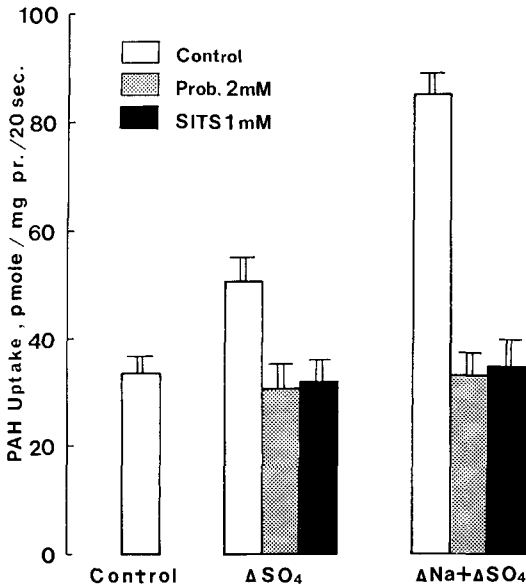


Fig. 9. Effects of 2 mM probenecid and 1 mM SITS on PAH uptake under various conditions. The concentrations of internal SO_4 (ΔSO_4) and external Na (ΔNa) were 20 and 100 mM, respectively. Control represents uptake in the absence of SO_4 and Na gradient. The experimental conditions are the same as in Fig. 8. Each value represents the mean \pm SEM of 4 duplicate experiments.

것으로 생각할 수 있으나 그 정도는 다른 보고에서 비해 낮았다(Inui et al., 1981; Kinsella et al., 1979; Scalaria et al., 1981). 본 실험에서 분리한 기저막 소포의 orientation은 막 소포중 open vesicle의 비는 Del Castillo와 Robinson(1982)의 결과 보다는 높았으나 sealed vesicle의 약 80% 정도가 right-side-out orientation이었다.

본 실험에서 사용된 기저막 소포를 통한 PAH의 이동이 용액의 osmolarity의 증가에 따라 감소되는 결과는 sealed vesicle 내로 PAH의 이동이 일어나는 것을 의미한다. 또한 기저막 소포를 통한 PAH의 이동은 2mM probenecid에 의해 억제되고 Na 농도 경사에 의해 증가되며 동력학적 분석시 PAH 이동의 Km값이 신장 피질 절편에서 관찰된 결과(Ecker and Hook, 1974; Park et al., 1971)와 유사하여 이 막소포에 유기산 이동의 운반체가 존재함을 의미하며 이와같은 결과들은 이 막소포

가 본 실험을 수행하는데 우수한 재료임을 가르킨다.

막에 대한 투과성이 다른 음이온을 이용한 실험에서는 대체되는 음이온에 따라 막 전위가 변할 수 있고 PAH 이동이 막전위에 영향을 받는다는 보고가 있기 때문에(Berner and Kinne, 1976) 이러한 효과를 배제하기 위해 본 실험에서는 소포내외에 100 mM의 K를 첨가하고 2 μM valinomycin으로 막소포를 처리하여 막전위를 고정시켰다. 이러한 상태에서 SO_4 및 SSO_3 는 Na 농도 경사에 의해 증가된 PAH 이동을 억제시켰으며(그림 4) 동력학적 분석시 V_{max} 값에는 영향을 미치지 않고 K_m 값만 변화시킴으로써 PAH 이동에 대해 경쟁적 억제 양상을 나타내었다(그림 5). 또한 소포내 PAH, SO_4 그리고 acetate등의 음이온을 부하시킨 경우 PAH 이동이 Na^+ 농도 경사가 없을 때도 증가하며 그 증가농도가 소포 내부의 SO_4 농도 증가에 따라 증가하였다. 이러한 결과는 근위세뇨관 기저막에 PAH/음이온 교환기전이 존재하고 이때 교환되는 음이온에는 유기 음이온 뿐만 아니라 SO_4 를 포함한 무기 음이온도 포함됨을 강력히 시사하고 있다.

여러 보고자들은(Kahn and Aronson, 1983; Kahn et al., 1983) 세뇨관강막에 광범위한 기질 특이성을 가진 음이온 교환기전이 존재하고 이 기전을 통해 PAH의 이동이 가능함을 보고하였기 때문에 위 결과가 기저막 소포에 섞여 있는 세뇨관강막에 의해 나타낸 것일 수도 있다. 그러나 결과는 나타내지 않았으나 본 실험에서 사용한 기저막 소포에서 D-glucose의 이동은 세뇨관강막 소포에서 관찰된 것과는 달리 Na^+ 농도 경사에 의해 증가되지 않았기 때문에 위의 가능성은 배제할 수 있겠다. 이러한 유기 음이온과 무기 음이온의 상호작용은 서론에서 열거된 것 외에도 여러 연구자들에 의해 간접적으로 관찰되었다. Probenecid와 PAH가 SSO_3 (Ullrich et al., 1980)와 oxalate 이동(Greger, 1981)을 억제시키며 SITS가 PAH 분비를 억제시키고(Koshier et al., 1980) 기저막 소포에서 SO_4 와 PO_4 유출을 감소시켰다는 것이 보고되었다(Grinstetin et al., 1980). 본 실험에서 증명된 PAH/음이온 교환기전이 여러가지 음이온에 대해 친화성을 가지는 것은 신장세포의 음이온 교환기전 뿐 아니라 적혈구의 음이온 교환기전에서도 관찰되었다. 이러한 광범위한 기질의 친화성을 설명하기 위하여 Aubert와 Motais(1975)는 교환기전의 음이온 결합부위에 대해 음이온이 결합할 때 "three-point attachment"의 가설

을 세웠다. 즉 교환기전의 음이온 결합부위와 유기 음이온의 3개의 밀접하게 배열된 O나 N residues가 상호작용함으로써 이동이 일어난다는 것이다. 본 실험에서 그 효과가 관찰된 acetate, PAH, SSO₃ 및 SO₄은 이 가설과 일치한다. 그러나 본 실험 결과 Cl, SCN, PO₄ 및 oxalate에 의해 PAH 이동이 영향을 받지 못하는데 대해서는 이들 이온들이 막 투과성이 커서 쉽게 농도 경사가 사라지기 때문인지 PAH/음이온 운반체에 대한 친화성이 낮기 때문인지는 본 실험 결과로서 정확히 설명하기 어렵다. 또한 막소포 내부에 존재시 PAH 이동을 증가시키는 acetate가 외부에 존재시 PAH 이동을 억제시키지 못하였는데 이 결과 또한 정확히 알 수 없으나 acetate가 외부에 100 mM로 높은 농도가 존재할 때 쉽게 내부로 들어간 acetate에 의한 trans-stimulation 효과가 외부의 억제 효과와 동시에 나타나기 때문일 수도 있다. 신장 기저막을 통한 PAH의 이동이 Na 농도 경사에 의해 증가됨은 본 실험 뿐만 아니라 (그림 8) 많은 다른 연구자들(Podevin et al., 1978 ; Sheikh and Møller, 1982)에 의해서도 보고되었는데 이 Na-PAH 운반체가 본 실험에서 관찰된 PAH/음이온 운반체와 동일한 운반체인지는 확실히 알기 어려우나 외부 Na 존재시 측정된 PAH 이동을 SO₄가 경쟁적으로 억제시키고(그림 5) 음이온 교환기전의 억제 물질인 1 mM SITS가 내부 SO₄에 의한 PAH 이동 뿐만 아니라 외부 Na에 의한 PAH 이동까지도 완전히 억제시키는 결과로 보아 두 기전이 동일한 운반체를 통해 일어날 수 있음을 시사하였다. 그러나 본 실험에서 외부 Na과 내부 SO₄가 동시에 존재시 PAH 이동에 부가적 효과를 나타내어 두가지 운반체가 독립적으로 존재하는 가능성도 배제할 수 없다. Kasher등(1983)은 쥐에서 신장 기저막 소포를 이용한 실험에서 내부 PAH와 외부 Na이 존재시 PAH 이동의 “overshoot” 현상을 관찰하여 PAH는 Na 경사에 의존적인 음이온 교환기전에 의해 이동할 것이라고 하였고 Löw등(1984)도 신장 기저막에서 SO₄가 Na-SO₄ 이동 및 Cl-SO₄ 교환기전에 의해 이동되며 이들 두기전이 동일한 SO₄ 운반체에 의해 일어날 것으로 추측하였으며 신장 기저막에 유기 음이온 뿐만 아니라 무기 음이온의 이동도 가능한 음이온 공통 교환기전이 있다고 하였다. 그러나 최근 Schron등(1985a ; 1985b)은 가토 최장의 BBM에서 Na-SO₄ cotransport와 SO₄-OH 교환기전의 독립된 운반체에 의해 일어나고 Knickelbein등(1985)은 같은 조

직에서 적어도 3가지 다른 음이온 교환기전이 존재한다고 하였고 신장 근위세뇨관에서 여러가지 유기산 이동이 단일 운반체에 의해서가 아니라 여러가지 다양한 운반체에 의해 일어난다는 보고(Møller and Sheikh, 1983)가 있기 때문에 PAH/음이온 교환기전과 Na dependent PAH 이동이 서로 다른 운반체에 의해 일어날 가능성을 배제할 수 없으며 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

가토 근위세뇨관에서 Percoll gradient에 의해 분리한 기저막소포(basolateral membrane vesicle)에서 PAH 이동에 미치는 여러 음이온들의 영향을 rapid filtration technique을 이용하여 관찰하였다.

Na-dependent PAH 측정은 용액내 SO₄와 SSO₃에 의하여 유의하게 억제되었으나 Cl, SCN, HPO₄, acetate 및 oxalate에 의해서는 영향을 받지 않았다. 용액내의 SO₄는 상경적으로 PAH 이동을 억제하였다.

소포내 음이온을 부하시킨 후 PAH 이동을 측정했을 때 acetate, SO₄ 및 PAH의 부하에 의해 PAH 이동은 유의하게 증가되었으며, 소포내 부하되는 SO₄의 농도가 증가함에 따라 PAH 측정은 증가되었다. SO₄에 의한 PAH의 trans-stimulation은 Na 농도 경사 존재시 더욱 증가되었으며 이들은 2 mM probenecid 및 1 mM SITS에 의해 억제되었다.

이들 결과들은 신피질세뇨관 세포의 기저막에 PAH/음이온 교환에 의해 PAH가 이동되는 기전이 존재한다는 것을 가르킨다. 그러나 PAH 이동에 영향이 없는 음이온들은 PAH/음이온 교환에 기질로써 작용하지 않기 때문인지 아니면 이들 음이온들의 높은 투과성에 의해 나타난 결과인지는 더욱 추구해 보아야 확인될 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Aubert, L. and Motais, R.: *Molecular features of organic anion permeability in ox red blood cells.* J. Physiol., London, 246:159, 1975.
- Berner, W. and Kinne, R.: *Transport of p-Aminohippuric acid by plasma membrane vesicles isolated from rat cortex.* Pflügers Arch., 361:269, 1976.

- Bolmstedt, J.W. and Aronson, P.S.: *pH gradient-stimulated transport of urate and p-aminohippurate in dog renal microvillus membrane vesicles*. *J. Clin. Invest.*, 65:931, 1980.
- Bradford, M.M.: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.*, 72:248, 1976.
- Chung, S.T., Park, Y.S. and Hong, S.K.: *Effect of cations on transport of weak organic acids in rabbit kidney slices*. *Am. J. Physiol.*, 219:30, 1970.
- Cross, R.J. and Taggart, J.V.: *Renal tubular transport: Accumulation of p-aminohippurate by rabbit kidney slices*. *Am. J. Physiol.*, 161:181, 1950.
- Del Castillo, J.R. and Robinson, J.W.L.: *The simultaneous preparation of basolateral and brush-border membrane vesicles from guinea pig intestinal epithelium and the determination of the orientation of the basolateral vesicles*. *Biochim. Biophys. Acta*, 688:45, 1982.
- Ecker, J.I. and Hook, J.B.: *Analysis of factors influencing the in vitro developmental pattern of p-aminohippurate transport by rabbit kidney*. *Biochim. Biophys. Acta*, 339:210, 1974.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorous*. *J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- Goldinger, J. M., Erasmus, B.D., Song, Y.K., Koschier, F. J. and Hong, S.K.: *Effects of SCN⁻ and NO₃⁻ on organic anion transport in rabbit kidney cortical slices*. *Biochim. Biophys. Acta*, 598:357, 1980.
- Goldinger, J.M., Khalsa, B.D.S. and Hong S.K.: *Photoaffinity labeling of organic anion transport system in proximal tubule*. *Am. J. Physiol.*, 247:C217, 1984.
- Greger, R.: *Renal transport of oxalate*. In: *Renal Transport of Organic Substances*, edited by R. Greger, F. Lang, and S. Silbernagl. Berlin: Springer-Verlag, 1981, p. 224-233.
- Grinstein, S., Tuner, R.J., Silverman, M. and Rothstein, A.: *Inorganic anion transport in kidney and intestinal brush border and basolateral membranes*. *Am. J. Physiol.*, 238:F452, 1980.
- Guggino, S.E., Martin, G.J. and Aronson, P.S.: *Specificity and modes of the anion exchanger in dog renal microvillus membranes*. *Am. J. Physiol.*, 244:F612, 1983.
- Hong, S.K., Goldinger, J.M., Song, Y.K., Koschier, F.J. and Lee, S.H.: *Effect of SITS on organic anion transport in the rabbit kidney cortical slice*. *Am. J. Physiol.*, 234:F302, 1978.
- Inui, K.-I., Tomonbu, O., Takano, M., Kitazawa, S. and Hori, R.: *A simple method for the isolation of basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney cortex*. *Biochim. Biophys. Acta*, 637:150, 1981.
- Jørgensen, P.L. and Skou, J.: *Purification and characterization of (Na⁺-K⁺)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney*. *Biochim. Biophys. Acta*, 233:366, 1971.
- Kahn, A. M. and Aronson, P.S.: *Urate transport via anion exchange in dog renal microvillus membrane vesicles*. *Am. J. Physiol.*, 244:F56, 1983.
- Kahn, A.M., Branham, S. and Weinman, E.J.: *Mechanism of urate and p-aminohippurate transport in rat microvillus membrane vesicles*. *Am. J. Physiol.*, 245:F151, 1983.
- Kasher, J.S., Holohan, P.D. and Ross, C.R.: *Na⁺ gradient-dependent p-aminohippurate (PAH) transport in rat basolateral membrane vesicles*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227:122, 1983.
- Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I. and Ross, C.R.: *Transport of organic ions in renal cortical luminal and antiluminal membrane vesicles*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 209:443, 1979.
- Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I. and Ross, C.R.: *Isolation of luminal and antiluminal membranes from dog kidney cortex*. *Biochim. Biophys. Acta*, 552:468, 1979.
- Knickelbein, R.G., Aronson, P.S. and Dobbins, J.W.: *Substrate and inhibitor specificity of anion exchangers on the brush border membrane of rabbit ileum*. *J. Memb. Biol.*, 88:199, 1985.
- Koschier, F.J., Stokols, M.F., Goldinger, J.M., Acara, M. and Hong, S.K.: *Effect of DIDS on renal tubular transport*. *Am. J. Physiol.*, 238:F99, 1980.
- Linhardt, K. and Walter, K.: *Phosphatases*. In: *Methods in Enzymatic Analysis*, edited by H.U. Bergmeyer. New York: Academic, 1963, p. 783-785.
- Löw, I., Friedrich, T. and Burckhardt, G.: *Properties of an anion exchanger in rat renal basolateral membrane vesicles*. *Am. J. Physiol.*, 246:F334, 1984.
- Møller, J.V. and Sheikh, M.I.: *Renal organic anion transport system: Pharmacological, physiological and biochemical aspects*. *Pharmacol. Rev.*, 34(4):315, 1983.
- Park, Y.S., Yoo, H.S. and Hong, S.K.: *Kinetic studies on transport of organic acids in rabbit kidney slices*.

- Am. J. Physiol.*, 220:95, 1971.
- Podevin, R.A., Boumendil-Povedin, E.F. and Priol, C.: Concentrative PAH transport by rabbit kidney slices in the absence of metabolic energy. *Am. J. Physiol.*, 235:F278, 1978.
- Scalera, V., Huang, Y.K., Hildemann, B. and Murer, H.: A simple isolation method of basal-lateral plasma membranes from rat kidney cortex. *Memb. Biochem.*, 4:49, 1981.
- Scalera, V., Storelli, D., Storelli-Joss, D., Haase, W. and Murer, H.: A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small-intestinal epithelial cells. *Biochem. J.*, 186:177, 1980.
- Schron, C.M., Knickelbein, R.G. and Aronson, P.S.: pH gradient-stimulated sulfate transport by rabbit ileal brush-border membrane vesicle: evidence for SO_4^- -OH exchange. *Am. J. Physiol.*, 249:G607, 1985a.
- Schron, C.M., Knickelbein, R.G. and Aronson, P.S.: Effects of cations on pH gradient-stimulated sulfate transport in rabbit ileal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, 249:G614, 1985b.
- Sheikh, M.I. and Møller, J.V.: Na^+ -gradient dependent stimulation of renal transport of p-aminohippurate. *Biochem. J.*, 208:243, 1982.
- Sheikh, M.I. and Møller, J.V.: Nature of Na^+ -independent stimulation of renal transport of p-aminohippurate by exogenous metabolites. *Biochem. Pharmacol.*, 32(18):2745, 1983.
- Tune, B.M., Burg, M.B. and Patlak, C.S.: Characteristics of p-aminohippurate transport in proximal renal tubules. *Am. J. Physiol.*, 217:1057, 1969.
- Ullrich, K.J., Rumrich, G. and Klöss, S.: Bidirectional active transport of thiosulfate in the proximal convolution of the rat kidney. *Pflügers Arch.*, 387:127, 1980.